

一氧化氮合成酶分型 (TNOS、iNOS、cNOS) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC17814

规格: 50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 40 mL×1 瓶	-20℃保存
提取液二	液体 0.6 mL×1 支	-20℃保存
缓冲液	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 5.2 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 50 μL×1 支	2-8℃保存
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂五	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂六	液体 1.3 mL×1 支	2-8℃保存
试剂七	液体 2.5 mL×1 支	2-8℃保存
试剂八	液体 50 μL×1 支	2-8℃保存
显色液 A 液	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
显色液 B 液	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制:

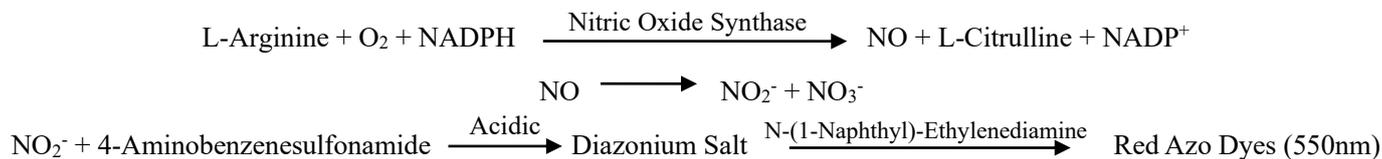
1. 提取液二: 为易挥发试剂, 用完后尽快密封, -20℃保存;
2. 试剂二: 试剂放于瓶内玻璃瓶内, 临用前取 1 瓶试剂二加入 6mL 缓冲液, -20℃分装保存 4 周, 避免反复冻融;
3. 试剂三工作液: 临用前根据样本量按照试剂三: 缓冲液=8μL: 792μL (0.8mL, 10T) 的比例配制, 现用现配;
4. 试剂四: 临用前取 1 支试剂四加入 0.6mL 缓冲液, -20℃分装可保存 4 周, 避免反复冻融;
5. 试剂五: 临用前取 1 支试剂五加入 1.2mL 缓冲液, -20℃分装可保存 4 周, 避免反复冻融;
6. 工作液: 临用前根据样本数量按照试剂一: 试剂二: 试剂三工作液: 试剂四=0.8mL: 2.0mL: 0.8mL: 0.2mL (3.8mL, 10T) 的比例配制工作液, 现用现配;
7. 试剂八工作液: 临用前根据样本量按试剂八: 缓冲液=10μL: 450μL (0.46mL, 约 11T) 的比例配制, 现用现配;
8. 显色液: 临用前根据样本数量按照显色液 A 液: 显色液 B 液=1:1 充分混匀, 现配现用;
9. 标准品: 10μmol/mL 亚硝酸钠。临用前取 5μL 10μmol/mL 亚硝酸钠标准液, 加入 995μL 蒸馏水, 配制成 0.05μmol/mL 亚硝酸钠标准液, 现配现用。

注: 试剂二、试剂四、试剂五为冻干试剂, 可能存在肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象, 此现象不影响使用, 实际质量相同。

产品说明:

一氧化氮合成酶（Nitric Oxide Synthase, NOS, EC 1.14.13.39, 此试剂盒后写为总NOS（TNOS））是生物体内催化L-精氨酸合成NO的一类酶，主要存在于血管平滑肌、巨噬细胞、内皮细胞、神经细胞、肝细胞、肾小球膜细胞等各种细胞中。根据其酶活性对钙离子的依赖性不同，分为结构型NOS（constitutive NOS, cNOS）和损伤诱导型NOS（inducible NOS, iNOS），前者需要一定浓度的钙离子方可激活，后者不依赖于外源钙离子。

NOS催化L-精氨酸、分子氧和NADPH，生成NO和NADP⁺，NO在水溶液中极易氧化生成NO₂⁻和NO₃⁻。在酸性条件下，NO₂⁻与重氮盐磺胺生成重氮化合物，进一步与萘基乙烯基二胺偶合，产物在550nm处有特征吸收峰，测定其吸光值，可以计算得到NOS活性大小。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、分析天平、恒温水浴锅、1mL玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织样本：建议称取 0.2g 样本，加入 0.98mL 提取液一和 0.02mL 提取液二，冰浴匀浆后，于 4℃，12000g，离心 15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。
2. 细菌/细胞样本：建议 1000 万细菌/细胞加入 0.98mL 提取液一和 0.02mL 提取液二，冰浴超声破碎（功率 200W，超声 3s，间隔 7s，总时间 5min），然后于 4℃，12000g，离心 15min，弃沉淀，取上清液置于冰上待测。
3. 液体样本：直接测定。若液体有浑浊则离心取上清测定。

注：可根据样本量将提取液一和提取液二按照 0.98mL：0.02mL 的比例混匀后进行样本前处理。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至550nm，蒸馏水调零。
2. 在2mL EP管按下表顺序加样：

试剂名称（μL）	总NOS测定管（A测定1）	iNOS测定管（A测定2）	标准管（A标准）	空白管（A空白）
样本	240	240	-	-
工作液	380	380	-	-
试剂五	80	-	-	-
试剂六	40	-	-	-
缓冲液	-	120	-	-
混匀，37℃反应60min，沸水浴5min（扣紧盖子），冷却后4℃，11000g离心10min，取全部上清于一个新EP管中。			-	-
上清液	全部上清液	全部上清液	-	-
试剂七	40	40	-	-
试剂八工作液	40	40	-	-

混匀, 37°C反应30min			-	-
标准液	-	-	240	-
蒸馏水	-	-	580	820
显色液	400	400	400	400

混匀, 常温静置10min, 取1mL反应液于1mL玻璃比色皿中测定550nm处各管吸光值, 分别记为A测定1、A测定2、A标准和A空白, 计算 ΔA 测定1=A测定1-A空白, ΔA 测定2=A测定2-A空白, ΔA 标准=A标准-A空白。空白管和标准管只需测1-2次。

三、NOS 活性计算

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每mg组织蛋白每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

$$(1) \text{ TNOS活性 (U/mg prot)} = (\Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (C \text{pr} \times V \text{样}) \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 0.83 \times \Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \div C \text{pr} \times F$$

$$(2) \text{ iNOS活性 (U/mg prot)} = (\Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (C \text{pr} \times V \text{样}) \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 0.83 \times \Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \div C \text{pr} \times F$$

$$(3) \text{ cNOS活性 (U/mg prot)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

2. 按样本质量计算

单位的定义: 每g组织每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

$$(1) \text{ TNOS活性 (U/g 质量)} = (\Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (W \times V \text{样} \div V \text{样总}) \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 0.83 \times \Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \div W \times F$$

$$(2) \text{ iNOS活性 (U/g 质量)} = (\Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (W \times V \text{样} \div V \text{样总}) \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 0.83 \times \Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \div W \times F$$

$$(3) \text{ cNOS活性 (U/g 质量)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

3. 按细菌/细胞数目计算

单位的定义: 每 10^6 个细菌/细胞每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

$$(1) \text{ TNOS活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = (\Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (N \times V \text{样} \div V \text{样总}) \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 0.83 \times \Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \div N \times F$$

$$(2) \text{ iNOS活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = (\Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div (N \times V \text{样} \div V \text{样总}) \times 10^3 \div T \times F$$

$$= 0.83 \times \Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \div N \times F$$

$$(3) \text{ cNOS活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

4. 按液体体积计算

单位的定义: 每mL液体每分钟催化产生1nmol NO定义为一个酶活单位。

$$(1) \text{ TNOS活性 (U/mL)} = (\Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div V \text{样} \times 10^3 \div T \times F = 0.83 \times \Delta A \text{测定1} \div \Delta A \text{标准} \times F$$

$$(2) \text{ iNOS活性 (U/mL)} = (\Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \times C \text{标准}) \times V \text{样} \div V \text{样} \times 10^3 \div T \times F = 0.83 \times \Delta A \text{测定2} \div \Delta A \text{标准} \times F$$

$$(3) \text{ cNOS活性 (U/mL)} = \text{总NOS活性} - \text{iNOS活性}$$

C标准: 0.05 μ mol/mL; V样: 反应体系中加入的样本体积, 0.24mL; V样总: 加入的提取液一和提取液二的总体积, 1mL; Cpr: 蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细胞或细菌数目, 以 10^6 计; 10^3 : 单位换算系

数, $1\mu\text{mol}=10^3\text{nmol}$; T: 反应时间, 60min; F: 样本稀释倍数。

注意事项:

1. NOS 稳定性差, 易变性失活, 建议使用新鲜样本实验, 如果不立即实验, 样本需-20°C保存。
2. 试剂二配制好后, 建议根据样本量取出所需试剂二, 剩余试剂二需尽快置于-20°C保存。
3. 如果 ΔA 测定小于 0.005 或测定管吸光值接近空白管, 可以增加样本量或者延长第一步 37°C反应时间后再进行测定; 如果 ΔA 测定大于 0.4, 建议将样本匀浆后的上清液用缓冲液适当稀释后再进行测定。注意同步修改计算公式。

实验实例:

1. 取0.2047g新鲜小鼠肝脏样本, 加入0.98mL提取液一和0.02mL提取液二进行冰浴匀浆, 离心后取上清, 按照测定步骤操作, 用1mL玻璃比色皿测得计算: ΔA 测定1=A测定1-A空白=0.088-0.000=0.088, ΔA 测定2=A测定2-A空白=0.045-0.000=0.045, ΔA 标准=A标准-A空白=0.380-0.000=0.380, 按样本质量计算得:
TNOS活性 (U/g 质量) = $0.83 \times \Delta A$ 测定1 \div ΔA 标准 \div W = 0.939 U/g 质量
iNOS活性 (U/g 质量) = $0.83 \times \Delta A$ 测定2 \div ΔA 标准 \div W = 0.480 U/g 质量
cNOS活性 (U/g 质量) = 总NOS活性- iNOS活性= 0.459 U/g 质量
2. 取240 μL 马血清样本, 按照测定步骤操作, 用1mL玻璃比色皿测得计算: ΔA 测定1=A测定1-A空白=0.036-0.000=0.036, ΔA 测定2=A测定2-A空白=0.021-0.000=0.021, ΔA 标准=A标准-A空白=0.380-0.000=0.380, 按液体体积计算得:
TNOS活性 (U/mL) = $0.83 \times \Delta A$ 测定1 \div ΔA 标准 = 0.079 U/mL。
iNOS活性 (U/mL) = $0.83 \times \Delta A$ 测定2 \div ΔA 标准 = 0.046 U/mL。
cNOS活性 (U/mL) = 总NOS活性- iNOS活性 = 0.033 U/mL。

参考文献:

- [1] List BM, Klösch B, Völker C. et al. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization[J]. Biochemical Journal, 1997, 323(1): 159-165.
- [2] Dawson J, Knowles RG. A microtiter-plate assay of nitric oxide synthase activity[J]. Molecular Biotechnology, 1999, 12(3): 275-279.
- [3] Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function[J]. European Heart Journal, 2012, 33(7): 829-837.
- [4] Kazakov A, Hall R, Jagoda P. et al. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase induces and enhances myocardial fibrosis [J]. Cardiovascular Research, 2013, 100(2):211-221.

相关系列产品:

- AC10317/AC10318 一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒 (酶法测定总NO)
AC17826/AC17946 一氧化氮 (NO) 含量检测试剂盒 (化学法)
AC17974/AC17813 一氧化氮合成酶 (NOS) 活性检测试剂盒